

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-294799

⑤ Int.Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 昭和63年(1988)12月1日
 C 12 Q 1/26 6807-4B
 1/54 6807-4B
 // C 12 Q 1/00 C-6807-4B 審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 グルコース及び1,5-アンヒドログルシトールの同時測定法

⑰ 特 願 昭62-128037

⑱ 出 願 昭62(1987)5月27日

⑲ 発 明 者 田 島 茂 群馬県藤岡市藤岡675-11
 ⑲ 発 明 者 橋 場 正 群馬県新田郡笠懸村阿左美804-12
 ⑲ 発 明 者 田 中 茂 夫 群馬県高崎市城山町1-9-6
 ⑲ 発 明 者 荻 内 正 彦 埼玉県大宮市指扇1702-3
 ⑳ 出 願 人 日本化薬株式会社 東京都千代田区富士見1丁目11番2号
 ㉑ 代 理 人 弁理士 竹田 和彦

明 細 書

1. 発明の名称

グルコース及び1,5-アンヒドログルシトールの同時測定法

2. 特許請求の範囲

1. 体液試料中のグルコース及び1,5-アンヒドログルシトールをカラムにて分離後ピラノースオキシダーゼを用いたバイオセンサーにより定量することを特徴とするグルコース及び1,5-アンヒドログルシトールの同時測定法。

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明は糖尿病の診断マーカーであるグルコースと新しい診断マーカーとして実用化が期待されている1,5-アンヒドログルシトール(以下1,5-AGという)のバイオセンサーを用いた同時測定法に関するものである。

<従来技術>

グルコースは糖尿病の診断マーカーとして古くから知られている。特に血糖値は糖尿病診断あるいは治療効果の判定に最も頻繁に活用される測定項目であり、バイオセンサー法を初めとして種々の測定法が実用化されている。

一方、1,5-AGはヒト髄液、血漿および尿中に存在し糖尿病において血漿中の量が低下する事が報告されている化合物である。この1,5-AGを定量する方法は従来から主にガスクロマトグラフィーによつて行われていた(糖尿病、25巻、1115~1118、1982年、吉岡等)。最近血漿中のグルコースを除いた後、ピラノースオキシダーゼ(以下PRODという)によつて1,5-AGを酸化し、そのとき生成する過酸化水素を比色により定量する方法が考案された。

<発明が解決しようとする問題点>

体液中のグルコース及び1,5-AGは、同じ糖尿病のマーカーでありながら、それぞれ別々に測定されている。

即ち、グルコースは、グルコースセンサー、ドライケミストリー等で測定され、1,5-A Gはガスクロマトグラフィー法や比色法等で測定されている。1,5-A Gは、ガスクロマトグラフィー法による測定では、被検液の前処理と1,5-A Gのラベル化が必要である。そのため分析に長時間を要し、多数の被検液の測定は困難であり、臨床的な定量法としては問題があつた。またP R O Dを用いた1,5-A Gの比色法でも複雑な前処理を必要とし臨床的な測定法としては問題が残る。またグルコースおよび1,5-A Gは臨床的意義が異なるマーカーであり、糖尿病の診断および治療効果の判定に有用であり両者を同時に測定すれば更に厳密な判定が可能である。しかし、両者を簡便に同時測定した例はない。

<問題点を解決するための手段>

従来から、グルコースを主とする糖類を酸化する酵素としてP R O Dが知られている。

最近、この酵素が無水環状糖アルコールである1,5-A Gをも酸化することが見い出され、1,5

ができることを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、体液試料中のグルコースおよび1,5-A Gをカラムで分離後P R O Dを用いたバイオセンサーにより定量することを特徴とするグルコース及び1,5-A Gの同時測定法に関するものである。

ところで血糖値即ち血中グルコース値は測定時の状態で変化するため、比較的安定している空腹時血糖値を指標にし、正常人で $100\text{mg}/\text{dl}$ 即ち $1\text{mg}/\text{ml}$ 以下であり、糖尿病ではこの濃度以上に上がることが知られている。また、1,5-A G値は状態による変化が少なく、正常人で $20\sim 50\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、糖尿病では $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下に下がると云われている。この両者を同時に測定するには検出器のダイナミックレンジが $1000\sim 10000$ 倍を必要とし、比色等の測定法では不可能である。しかし、本発明によるP R O Dを用いたバイオセンサーでは広いダイナミックレンジを有し、両者を同時に測定することができる。即ち、本発明は特定の分離方法と特定のバイオセン

-A Gの比色定量法が開発された。この方法では血中の糖類を完全に除去することによつて1,5-A Gのみを定量している。

本発明者らは上記知見を積極的に活用し、グルコースおよび1,5-A Gを同時定量する方法を種々検討した。

P R O Dは酵素としての基質特異性が低く、種類の糖類と反応することが知られており、例えばD-キシロース、L-ソルボース、D-グルコノラクトン等とも反応する(酵素ハンドブック、P 66、朝倉書店)。

そのため体液中のグルコース及び1,5-A Gのみを検出する事は難しく、又、体液成分をそれぞれ単離することは非常に困難であり容易ではない。

ところが、種々検討の結果、血中等の体液中のグルコース及び1,5-A Gを測定する場合、カラムを用いてグルコース及び1,5-A Gを分離しこれをP R O Dを用いたバイオセンサーにより定量した場合、他の糖類が共存していても、グルコースと1,5-A Gを定量的に精度よく検出すること

サーの持つ広いダイナミックレンジと特異性を巧みに組合せることにより完成したものである。

本発明で使用するグルコース及び1,5-A Gを分離するカラムはバイオセンサーの検出に影響を及ぼさない溶媒系又はバイオセンサーの検出に影響を及ぼさない溶媒系に変更可能な溶媒系で用いられる糖分離用カラムを用いることができる。糖分離用カラムにおいて、分子サイズ分離、イオン排除分離、配位子交換分離、分配分離等の原理に基づいて分離されるが、その組合せにより更に分離を良くすることも可能である。この本発明で用いるカラムとしては種々のものが使用できるが、好ましいものとしては、配位子交換の原理に基づいた陰イオン交換カラムが挙げられ、具体的にはダイオネックス社製H P I C - A B 6、A B 7、日立製作所製^{*} 3015-N等が挙げられる。

移動相(溶媒系)としては水系が好ましいが、バイオセンサーの酵素P R O Dを失活させないものであればアルコール、アセトニトリル等の有機溶媒を含んだ系でも使用することができる。また

分離の条件ではP R O Dが失活するものでも、カラム分離の後に酵素反応の条件に変更できるものであれば使用可能である。例えばH P I C - A B 6 (ダイオネックス社製カラム)では分離時には移動相(溶媒系)としてアルカリ水溶液を使用するが、その後酸にて中和する事によりバイオセンサーにてグルコース及び1,5-A Gの検出が可能となる。

本発明で用いるバイオセンサーとしては、例えばP R O D固定化膜を過酸化水素検出電極表面に装着したフローセル型検出器が挙げられ、これは、グルコースあるいは1,5-A Gは酸素の存在下にP R O Dにより酸化され、その時発生する過酸化水素を過酸化水素検出^(電)極により定量するセンサーである。P R O D固定化膜は一般的に行われている膜固定化法により製造でき、この膜固定化法としては吸着法、架橋法、共有結合法のいずれの方法も採用できるが、過酸化水素の透過性の良い膜を得る方法を採用するのが望ましい。例えば膜透過性の良いトリアセチルセルロース膜に酵素を固

る。

本発明で用いられるP R O DはI U P A C - I C Bの名命法委員会でE C 1, 1, 3, 10 あるいはE C 1, 1, 3, 11と分類し得るものであれば特に制限はなく、例えばポリポラスオブツサス(Polyaporous obtusus)A T C C 2 6 7 3 3の産生するものがあげられる。

また、この酵素の比活性は高いほど定量にとって良好なことは云うまでもないことであるが、必ずしも最高純度のものを要求するものではない。

本発明において定量しようとする被検液は1,5-A Gとグルコースを定量したいものなら制限はなく、一般的に体液と呼ばれている血漿、血清、尿、髄液等があげられる。また、体液中に共存するタンパク質を除タンパクした試料も用いられる。除タンパクの方法は過塩素酸、トリフロロ酢酸等の酸を用いた方法、塩化バリウム、水酸化バリウム等の塩やアルカリを用いた方法、またアルコール等の有機溶剤を用いた方法、あるいはカラムによる分離があり、いずれの方法を採用しても良い

定化する方法は電気化学協会編「新しい電気化学」(培風館)P 2 4 8に記載されており、このように過酸化水素の透過性の良い膜は公知の方法により簡単につくることができる。得られたP R O D膜を電極表面に装着するにはナイロンネット等で押える方法、あるいは透析膜のように基質透過性の良い膜で包み込む方法等が用いられる。

また、本発明で用いるバイオセンサーとしては、水不溶性の粒状担体に酵素を固定化し小カラムに充填し小カラムの後に配置した過酸化水素検出電極により生成してくる過酸化水素を検出する型式もあり、膜型式と同様にグルコース及び1,5-A Gの定量が可能である。更には、過酸化水素検出電極としては、生成する過酸化水素を検出する過酸化水素電極や電気化学検出器を用いるのが最適であるが、酵素酸化の際に消費される酸素を酸素電極を用いて定量する事も可能である。また酵素酸化生成した過酸化水素を他の化合物例えばフェロシアン化カリウムをフェリシアン化カリウムに変換し電気化学検出器で測定することも可能であ

が、1,5-A Gとグルコースのカラム分離及び酵素反応に障害のない方法を採用すべきである。

また、除タンパクの後必要に応じてpHの調整を行うこともできる。

本発明方法において、体液試料はそのままあるいは必要により希釈後、又、必要により除タンパクを行なったのちカラムを通し(この場合、流量は通常0.1~2cc/分程度とするのが好ましい)、次いでこれをバイオセンサーに接触させる。カラム流出液のバイオセンサーに接触させる際の温度は20~40℃位であることが好ましく、又、pHは5~8位が好ましく、より好ましくは5~7位である。

<実施例>

実施例1

測定装置は通常の高速液体クロマトグラフィー装置で、0.1N-NaOH水溶液を流速0.5ml/min₁でカラムに通した。カラムにはH P I C - A B 6 (ダイオネックス社製4.6mmφ×250mm)を用いた。カラム流出液は0.1ml/minの流速で供給

される $0.4\text{ N} - \text{H}_3\text{PO}_4$ 水溶液とミキシングジョイントを通じて混合され、ミキシングコイル ($0.5\text{ mm} \phi \times 10\text{ m}$) にて完全に混合され pH は 5.7 となった。その後この混合液流をフローセル (容量 $100\text{ }\mu\text{L}$) にセットしたバイオセンサーに接触させ、1,5-A G およびグルコースの量を、発生した過酸化水素の量により定量した。

バイオセンサーは、過酸化水素電極〔(株) エイブル社製〕の表面 ($5\text{ mm} \phi$) に同じ大きさの PRO D 固定化膜をナイロンネットで装着して使用した。PRO D 固定化膜は以下の方法により作製した。

即ち、PRO D (宝酒造 (株) 製 $5.2\text{ U} / \text{mg}$) 10 mg と牛血清アルブミン (シグマ社製) 6 mg を $1/15\text{ M}$ リン酸緩衝液 (pH 7.2) 0.6 mL に溶解し、1% グルタルアルデヒド水溶液 0.2 mL を加え、混合する。混合後直ちにニトロセルロース膜 ($25\text{ mm} \phi$ 孔径 $3\text{ }\mu\text{m}$) 2 枚の上にゆつくり滴下し、全体が均一になる様に広げて $4\text{ }^\circ\text{C}$ で一夜風乾して得た。

上記系において、先ず、カラムの前に設けたインジェクターより 1,5-A G とグルコースの標準

液を $50\text{ }\mu\text{L}$ 注入し、バイオセンサーにより検出し、1,5-A G とグルコースの検量線を作製した。その結果を第 1 図に示した。別に、糖尿病患者及び正常人の血漿 $200\text{ }\mu\text{L}$ に 60% 過塩素酸水溶液 $15\text{ }\mu\text{L}$ を加えて振とうの後、 $3000\text{ rpm} \times 15$ 分の遠心分離を行い除タンパクした。その上清 $150\text{ }\mu\text{L}$ に 40% 水酸化ナトリウム $10\text{ }\mu\text{L}$ を加えたものをサンプルとした。このサンプルを検量線を作成した場合と同様に $57\text{ }\mu\text{L}$ (血清分として $50\text{ }\mu\text{L}$) 上記系のインジェクターに注入し、バイオセンサーにより検出し、その面積値から検量線を用いて定量した。その結果を表 - 1 に示す。

実施例 1 において、NaOH 水溶液として $0.05\text{ N} - \text{NaOH}$ 水溶液を流速 $0.5\text{ mL} / \text{min}$ でカラムに通し又、 H_3PO_4 水溶液として $0.2\text{ N} - \text{H}_3\text{PO}_4$ 水溶液を流速 $0.1\text{ mL} / \text{min}$ で供給し、カラムに $\Phi 3013 - \text{N}$ (日立製作所製、 $40\text{ }\phi \times 150\text{ mm}$) を用い、それ以外は実施例 1 と同様にして測定を行った。その結果を実施例 1 と合わせて表 - 1 に示す。

< 発明の効果 >

本発明によれば糖尿病のマーカーであるグルコースと 1,5-A G を同時に測定することが出来、両方に指標により糖尿病の診断を容易に行なうことが出来る。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は実施例 1 の検量線を示したものである。

特許出願人 日本化薬株式会社

表 - 1

サンプル番号	実施例 1		実施例 2	
	1,5-A G $\mu\text{g} / \text{mL}$	グルコース mg / dL	1,5-A G $\mu\text{g} / \text{mL}$	グルコース mg / dL
糖尿病 1	1.5	219	1.4	239
" 2	1.9	164	1.6	170
" 3	3.2	125	3.2	118
正常人 1	21.0	72	22.0	75
" 2	30.6	87	30.2	88
" 3	35.4	79	35.9	80

注：サンプルは空腹時採血した。

